татов в разработанном варианте ИФА, совпадающее с количеством отрицательных проб в «CIVTEST APP»;

D – количество отрицательных проб в «CIVTEST APP».

Чувствительность разработанного метода относительно коммерческой тест-системы составила 94%, специфичность – 97%.

Таким образом, сравнительный анализ данных, полученных при тестировании сывороток крови свиней в двух реакциях, показал высокую специфичность и чувствительность разработанного метода при анализе полевых сывороток.

Выводы

На основе липополисахаридных антигенов разработан непрямой вариант ИФА для определения антител к бактериям *A. pleuropneumoniae* серотип 1, серотип 2, серотип 5 в сыворотках крови свиней.

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием липополисахаридных антигенов *A. pleuropneumoniae* серотипов 1, 2 и 5 для выявления антител в сыворотках крови свиней.

SUMMARY

A test-system on the basis of indirect ELISA using lipopolysaccharide antigens of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5 for detection of antibodies in porcine sera was developed.

Литература

1. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции: Справочник / Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волкова [и др.] М.: Агропромиздат, 1986. С. 240-243.
2. Сидоров, М.А. Гемофилезы животных / М.А. Сидоров, Д.И.Скородумов. М.: Агропромиздат, 1986. С. 50-51.
3. Шадрова, Н.Б. Получение специфических компонентов Actinobacillus pleuropneumoniae для иммуноферментного анализа / Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова, О.И. Ручнова // Ветеринарная патология. (В печати)
4. Detection of antibodies to Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 12 in pig serum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay / L.O. Andresen, J. Klausen, K. Barfod, V. Sorensen // Vet. Microbiol. 2002. V.89. P. 61-67.
5. Chiers, K. Actinobacillus pleuropneumoniae infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles / K. Chiers, E. Donne, I. Overbeke [et al.] // Vet. Microbil. 2002. V.85, №4. P. 343-352.
6. Serodiagnosis of Swine Pleuropneumonia due to Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 7 and 4 Using Long-Chain Lipipolysaccharides / M. Gottschaik, E. Altman, N. Charland [et al.] // Can. J. Vet. Res. 1997. V.61. P. 62-65.
7. Evaluation of saline boiled extract, capsular polysaccharides and long-chain lipopolysaccharides of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1 as antigens for serodiagnosis of swine pleuropneumonia / M. Gottschaik, E. Altman, N. Charland [et al.] // Vet. Microbiol. 1994. V.42. P. 91-104.
8. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunjsorbent assay. 2.Comparison of computation methods for measuring antibody titers in a single serum dilution / D.B. Snyder, W.W. Marquardt, E.T. Malison, E. Russec // Avian Dis. 1982. Vol.27. P. 474-484.

УДК 619:616.98:579.843.94:615.371

Ф.А. Ширяев, А.В. Потехин, В.С. Русалеев

РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕМОФИЛЕЗНОГО ПОЛИСЕРОЗИТА СВИНЕЙ

Введение

В настоящее время респираторная патология свиней остается одной из наиболее актуальных и экономически значимых проблем ветеринарии. В этой категории ведущее место занимают болезни бактериальной этиологии, в частности гемофилезный полисерозит свиней (болезнь Глессера). Заболевание широко распространено на территории Российской Федерации [3, 5] и характеризуется серозно-фибринозным воспалением перикарда, плевры, брюшины, а также артритом и негнойным менингоэнцефалитом [7, 9].

Основополагающим в комплексе мероприятий по борьбе с гемофилезным полисерозитом является профилактическая иммунизация животных [7, 8]. В качестве средств иммунопрофилактики за рубежом предложен ряд сорбированных и эмульсионных инактивированных вакцин. Однако имеющиеся биопрепараты из-за высокой стоимости не нашли широкого применения в нашей стране, что вызывает необходимость изыскания новых средств специфической профилактики данного заболевания.

В технологии изготовления противобактериальных вакцин главное место отводится этапу получения микробной мас-

сы с заданными биологическими свойствами [1, 2, 4, 6]. В отечественной и зарубежной литературе довольно подробно рассматриваются общие вопросы оптимизации процессов культивирования и инактивации микроорганизмов, принципы изготовления противобактериальных вакцин, методы оценки качества биопрепаратов. Однако данные относительно оптимальной питательной среды для возбудителя гемофилезного полисерозита, условий выращивания и режимов инактивации бактерий этого вида, для производства вакцин, крайне скудны.

Поэтому целью данной работы было отработать технологию изготовления вакцины против гемофилезного полисерозита свиней и изучить ее антигенные и иммуногенные свойства в лабораторных условиях.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии *Haemophilus parasuis* штамм «Ил-1», депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов.

Для культивирования бактерий *H. parasuis* использовали: соево-казеиновый бульон (СКБ) и бульон на основе триптического гидролизата казеина (ТГК) фирмы «Himedia»; триптозо-соевый бульон (ТСБ) и бульон на основе триптического гидролизата по Хоттингеру (ТГХ), приготовленные отделом химико-терапевтических препаратов ФГУ «ВНИИЗЖ». В качестве V-фактора роста использовали дрожжевой экстракт, приготовленный лабораторией микробиологии ФГУ «ВНИИЗЖ».

При оптимизации процесса культивирования бактерии выращивали глубинным методом на УВМТ-12-250 и в аппаратах АК-210. Основные параметры роста микроорганизмов определяли по формуле

$$\mu = 2{,}3\ (lgX/lgX_0)/t$$, где

μ – удельная скорость роста микроорганизмов ($ч^{-1}$);

X_0 и X – начальная и конечная концентрация микробных клеток (КОЕ/$см^3$);

t – время культивирования микроорганизмов (ч)

Инактивацию бактерий *H. parasuis* проводили с использованием формалина производства «Метафракс» с содержанием формальдегида 36%. Процесс инактивации осуществляли при 60 об/мин и 37° С. Расчет параметров инактивации производили по формуле

$$e\text{-}kt = X_i/X_0$$, где

k – константа скорости инактивации ($ч^{-1}$);

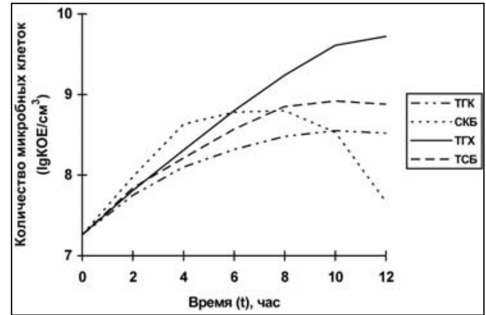


Рис. 1. Динамика роста бактерий *H. parasuis* на различных питательных средах

t – время инактивации (ч);

X_0 – исходная концентрация микробных клеток (lgКОЕ/$см^3$);

Xi – остаточное количество микробных клеток (lgКОЕ/$см^3$)

Очищали и концентрировали антиген на проточной центрифуге. Эмульсионную форму вакцины готовили, используя масляный адъювант Montanide ISA-70, который смешивали с полученным антигеном в соотношении 70:30. Процесс эмульгирования осуществляли в коллоидной мельнице.

Для изучения иммунобиологических свойств экспериментальной вакцины в работе использовали 20 поросят 35-дневного возраста. Животных иммунизировали двукратно с интервалом 21 день, в дозе 1 $см^3$ на поросенка. Антигенные свойства бактерий *H. parasuis* оценивали путем определения титра поствакцинальных антител в крови поросят в реакции агглютинации (РА) традиционным методом. Титр специфических антител выражали в логарифмах (log_2). Иммуногенную активность вакцины против гемофилезного полисерозита свиней определяли методом контрольного заражения поросят.

Результаты и обсуждение

Основной критерий при подборе оптимальных условий культивирования возбудителя гемофилезного полисерозита – получение максимального количества биомассы.

Выбор питательной среды основывался на изучении динамики роста бактерий *H. parasuis* в различных средах отечественного и импортного производства. Результаты этих исследований представлены на рис. 1.

Таким образом, было установлено, что оптимальной средой для культивирования *H. parasuis* является среда на основе триптического гидролизата по Хоттингеру. При выращивании бактерий в данной питательной среде отмечали высокий показатель

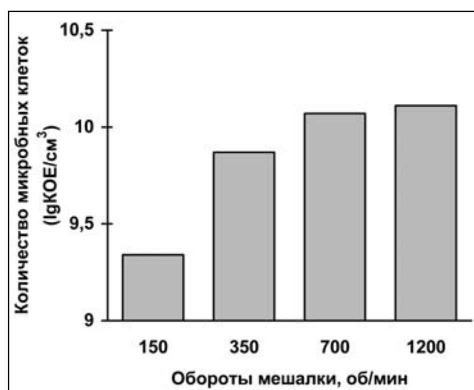


Рис. 2. Накопление бактерий *H. parasuis* в зависимости от интенсивности перемешивания питательной среды

удельной скорости роста и наибольшее накопление возбудителя – μ=0,540±0,035 ч$^{-1}$ и X=9,73±0,04 lgKOE/см^3.

При подборе режимов культивирования основное внимание уделяли интенсивности перемешивания питательной среды. Глубинное культивирование в аппаратах АК-210 проводили в режимах с различной скоростью вращения мешалки – 150, 350, 700 и 1200 об/мин, в течение 12 часов.

Как показано на рис. 2, выращивание возбудителя в режиме 150 об/мин обеспечивало наименьшее накопление бактерий *H. parasuis* X=9,34±0,04 lgKOE/см^3. Увеличение скорости вращения мешалки до 700 об/мин позволяло получать бульонную суспензию с концентрацией живых микробных клеток штамма «Ил-1» X=10,07±0,03 lgKOE/см^3.

Дальнейшее увеличение скорости вращения мешалки до 1200 об/мин позволило лишь незначительно увеличить накопление *H. parasuis* – X=10,15±0,04 lgKOE/см^3. В то же время увеличение оборотов при перемешивании питательной среды до 1200 об/мин резко влияло на интенсивность пенообразования. В этом случае использование механического пеногасителя было неэффективным, а использование только химического пеногасителя приводило к появлению его в питательной среде в больших количествах (>1%), что вызывало определенные трудности в дальнейшем при очистке и концентрировании антигена.

Следующий этап – отработка режима инактивации возбудителя гемофилезного полисерозита свиней. На рис. 3 отображены кривые выживания *H. parasuis* при воздействии формалина, а также кривая гибели бактерий в фазе отмирания (ф.о.).

Данные по изучению кинетики инактивации показали, что гибель бактерий *H. parasuis* при воздействии формалина и в ф.о. идет с постоянной скоростью, то есть процессы гибели микроорганизмов подчиняются экспоненциальной зависимости.

Показатель константы скорости инактивации при двукратном снижении концентрации формалина также снижался вдвое и составлял для 0,2% формалина 23,44±2,11 ч$^{-1}$, для 0,1% – 11,72±1,88 ч$^{-1}$, для 0,05% – 5,86±0,72 ч$^{-1}$, для 0,025% – 2,94±0,37 ч-1, при гибели бактерий в ф.о. – 1,66±0,22 ч$^{-1}$.

Таким образом, руководствуясь принципом щадящей инактивации и учитывая тот факт, что при использовании предельно низких концентраций формалина (0,025%) процесс инактивации бактерий может быть обратим, мы определили 0,05% формалина как оптимальную кон-

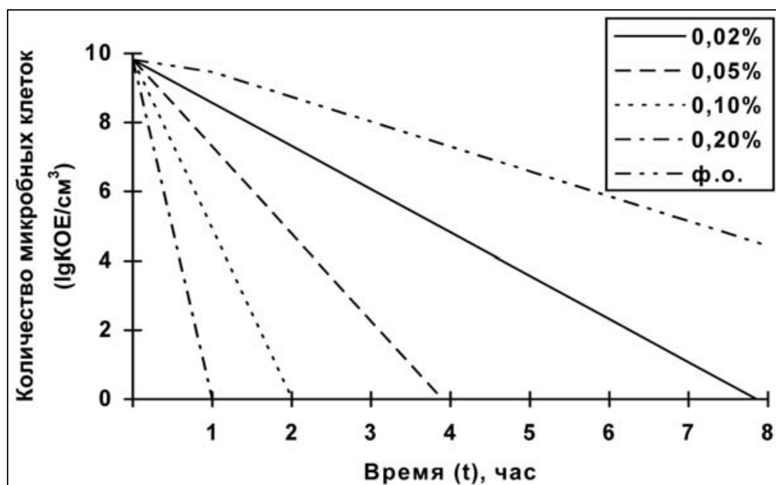


Рис. 3. Инактивация бактерий *H. parasuis* формалином

Таблица

Иммуногенная активность H. parasuis в составе вакцины

Группа животных	Клинические признаки	Патологоанатомические признаки	Выделение культуры H. parasuis
Вакцинированные	0/10*	0/10	0/10
Невакцинированные	10/10	7/10	8/10

* количество положительных животных / общее количество животных

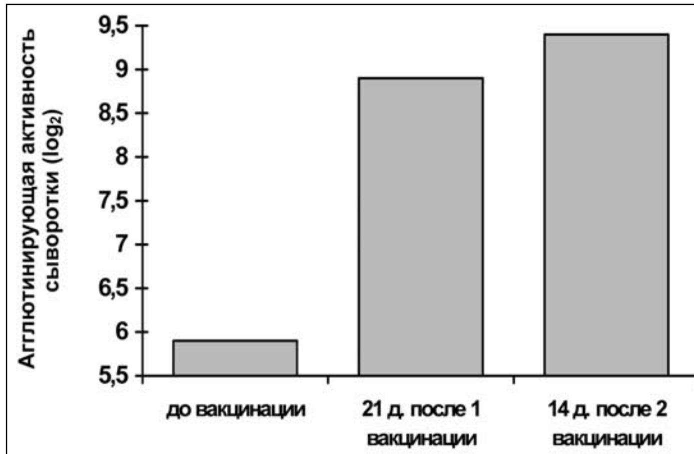


Рис. 4. Антигенная активность *H. parasuis* в составе вакцины

центрацию для инактивации бактерий данного вида.

Завершающим этапом в работе было изучение иммунобиологических свойств полученного антигена в составе экспериментальной вакцины против гемофилезного полисерозита свиней инактивированной эмульсионной.

На рис. 4 отображены данные по изучению антигенных свойств экспериментальной вакцины, которые показывают динамику образования антител в крови иммунизированных животных. Из представленных данных видно, что уже через три недели после первой вакцинации происходит значительная выработка специфических антител к *H. parasuis*. Повторное введение биопрепарата усиливало антигенный ответ.

При изучении иммуногенных свойств экспериментальной вакцины поросят через 14 дней после второй иммунизации подвергали контрольному заражению предварительно оттитрованной минимальной инфицирующей дозой *H. parasuis* «Ил-1» – 2 млрд микробных клеток. За животными вели наблюдение в течение 10 суток. Результаты контрольного заражения представлены в таблице.

Через 24 часа после заражения у всех поросят контрольной группы отмечали появление клинических признаков заболевания: повышение температуры тела до 40,8-41,5° С, угнетение, отказ от корма, у некоторых животных кашель, цианоз слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, болезненность брюшной стенки. При патологоанатомическом исследовании отмечали изменения в легких в виде катаральной бронхопневмонии, у некоторых животных – очаговые кровоизлияния. Признаки полисерозита в виде серозно-фибринозного воспаления плевры, брюшины и перикарда обнаружили у семи из десяти контрольных (невакцинированных) поросят. По результатам бактериологического исследования заболевание поросят контрольной группы гемофилезным полисерозитом было подтверждено в восьми случаях.

У вакцинированных поросят опытной группы клинические признаки заболевания и патологоанатомические изменения отсутствовали, результаты бактериологического исследования были отрицательными.

Выводы

В ходе проведенных исследований были подобраны условия культивирования и отработан режим инактивации бактерий H. parasuis. Полученный антиген был использован при изготовлении вакцины против гемофилезного полисерозита свиней инактивированной эмульсионной, антигенная и иммуногенная активность которой доказана экспериментально.

РЕЗЮМЕ

Подобрана оптимальная питательная среда для выращивания возбудителя гемофилезного полисерозита свиней глубинным методом. Отработаны режимы культивирования и инактивации бактерий *Haemophilus parasuis* с целью получения антигена для инактивированных вакцин. Изготовлена инактивированная эмульсионная вакцина против гемофилезного полисерозита свиней, основные иммунобиологические свойства которой изучены на поросятах в лабораторных условиях.

SUMMARY

The optimal nutrient medium for cultivation of porcine *Haemophillus polyserositis* agent using an in-depth method was selected. Regimes for *H. parasuis* bacteria cultivation and inactivation aimed at antigen production for inactivated vaccines were evaluated. The inactivated emulsion vaccine against porcine *Haemophillus polyserositis* was produced and its main immunobiologic properties were studied in piglets under laboratory conditions.

Литература

1. Баснакьян, И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина, 1992. 192 с.
2. Беккер, М.Е. Биотехнология / М.Е. Беккер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. М.: Агропромиздат, 1990. С. 7-149.
3. Биохимические и антигенные свойства изолятов рода Haemophilus / О.В. Прунтова, В.С. Русалеев, В.М. Гневашев, О.И. Ручнова // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: матер. Междунар. науч. конф. молодых ученых. Владимир, 2004. С. 45-47.
4. Перт, С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 333 с.
5. Приходько, С.М. Гемофилезный полисерозит свиней (диагностика, профилактика): автореф. дис.… канд. биол. наук. / Приходько С.М. Щелково, 2003. 23 с.
6. Самуйленко, А.Я. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов: в 2-х т. / А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубан. М., 2000. Т.1. 375 с.
7. Сидоров, М.А. Гемофилезы животных / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов. М.: Агропромиздат, 1986. 176 с.
8. Kielstein, P. Designation of 15 serovars of Haemophilus parasuis on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts / P. Kielstein, V.J. Rapp-Gabrielson //J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30, №4. P. 862-865.
9. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance / P. Kielstein, H. Wuthe, O. Angen [et al.] // Vet. Microbiol. 2001. Vol. 81, №3. P. 243-255.

УДК 619:616.98:579.842.14:573.6.086.83:57.083.3

Ю.В. Капускина, О.В. Прунтова

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ БАКТЕРИЙ *SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIES ENTERICA* И ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК К НИМ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Введение

Сальмонеллез – один из наиболее широко распространенных зооантропонозов во многих странах мира, в том числе и в России [3]. Патогенные серодварианты сальмонелл вызывают у людей и животных заболевания, характеризующиеся различными клиническими проявлениями. У людей они вызывают пищевые токсикоинфекции при употреблении инфицированных продуктов животного происхождения. У птиц весьма распространены латентные инфекции – сальмонеллоносительство [4].

Бактерии *Salmonella typhimurium (S. typhimurium)* и *Salmonella enteritidis (S. enteritidis)* являются возбудителями сальмонеллеза птиц, относящимися к роду *Salmonella* семейства *Enterobacteriaceae*. Идентифицировано более 2300 серотипов сальмонеллы, из которых только 10% было выделено у домашней птицы. Известно, что серотипами, наиболее часто выделяемыми от цыплят, а также людей являются *S. enteritidis* и *S. typhimurium* [3, 4].

В настоящее время в большинстве развитых стран разрабатываются программы мероприятий, направленные на улучшение ситуации по заболеваниям, вызываемым сальмонеллами, включающие своевременную и качественную диагностику. В связи с предстоящим вступлением России в ВТО особое внимание должно быть уделено мониторингу сальмонеллеза птиц.

Эта задача осложняется трудностями в идентификации штаммов и серотипов ввиду широкой вариабельности вирулентных и антигенных свойств возбудителя.

Поэтому для постановки окончатель-